



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

مرکز تحقیقات فیزیولوژی

پایان نامه مقطع دکترای تخصصی رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

بررسی تأثیر اوروتنسن II بر بیان ژن های آپولیپوپروتئین B_{100} ، آپولیپوپروتئین A-I
و پاراکسوناز-1 در سلول های کبدی رده HepG2

توسط: امیرحسین خوشی

اساتید راهنما:

دکتر غلامعباس محمدی، دکتر احمد غلامحسینیان

سال تحصیلی: ۱۳۹۱-۹۲

**Effect of Urotensin II on Apolipoprotein B₁₀₀, Apolipoprotein A-I
and Paraoxonase-1 Gene Expression in HepG2 Cell Line**

A Thesis
Presented to
The Graduate Studies

By

Amirhosein Khoshi

In Partial Fulfillment
of the Requirements for the Degree
Doctor of Philosophy in:

Clinical Biochemistry

Kerman University of Medical Sciences
Afzalipour School of Medicine
Physiology Research Center

August 2013



چکیده

مقدمه و هدف: آترواسکلروز، در نتیجه ی یک التهاب مزمن عروقی و رسوب لیپیدها و لکوسیت ها در دیواره عروق شریانی، خصوصاً شریان های کرونری قلب رخ می دهد و مهمترین عامل بیماری های شریان کرونری قلب (CAD) می باشد. دیس لیپیدمی ها، نقش مهمی در پاتوژنز آترواسکلروز ایفاء می کنند. افزایش تولید آپولیپوپروتئین B_{100} (apo B) در سلول های کبدی باعث افزایش مقدار لیپوپروتئین های حاوی apo B₁₀₀ در گردش خون شده و این امر نهایتاً منجر به آترواسکلروز و بیماری شریان کرونری قلب می شود. لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) با مکانیسم های مختلف، خصوصاً انتقال معکوس کلسترول می تواند دارای اثرات حفاظتی بر سیستم قلبی عروقی باشد. آپولیپوپروتئین A-I (apo A-I) به عنوان پروتئین اصلی موجود در HDL، نقش مهمی در انتقال معکوس کلسترول از بافت های محیطی به کبد دارد. علاوه بر این، پارواکسونال-1 (PON1) به عنوان یک پروتئین آنتی اکسیدانسی مرتبط با HDL نیز احتمالاً از طریق مهار پراکسیداسیون لیپیدهای موجود در لیپوپروتئین های با چگالی کم (LDL) می تواند در جلوگیری از آترواسکلروز نقش داشته باشد. افزایش apo B₁₀₀ و یا کاهش مقادیر apo A-I و عامل مهم در دیس لیپیدمی هستند که می تواند در بروز آترواسکلروز دخیل باشد. افزایش فشار خون، از دیگر عوامل خطر مستقل برای آترواسکلروز می باشد، که نقش آن در ایجاد آترواسکلروز به خوبی شناخته شده است. اورونئین II (UII) به عنوان قوی ترین عامل منقبض کننده عروق، در افزایش فشار خون و آترواسکلروز می تواند دخالت داشته باشد. از آنجایی که افزایش فشار خون به همراه افزایش لیپوپروتئین های حاوی apo B₁₀₀ و یا کاهش HDL / apo A-I از عوامل مهم پاتولوژیک در آترواسکلروز محسوب می شوند، هدف از انجام این مطالعه ارزیابی اثر اورونئین II بر بیان ژن های آپولیپوپروتئین B_{100} ، آپولیپوپروتئین A-I و پارواکسونال-1 در سطح mRNA و پروتئین در سلول های کبدی زده HepG2 می باشد.

مواد و روش ها: سلول های HepG2 با غلظت های 10، 50، 100 و 200 نانومول در لیتزر اورونئین II تیمار شدند و تیمار کردن سلولها 6 بار در دفعات مختلف صورت گرفت (n=6). 24 ساعت پس از تیمار سلولها، نمونه های RNA توتال و پروتئین از سلولها استخراج شدند. پس از تبدیل mRNA سلولها به cDNA طی واکنش رونویسی معکوس (Reverse Transcription)، واکنش زنجیر پلیمرز در زمان واقعی (Real time PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن های مطالعه، apo A-I، apo B₁₀₀ و PON1، انجام گرفت. تا میزان mRNA به صورت افزایش فلورسانس در چرخه های PCR (Cycle Threshold; C_T) حاصل شود. به منظور تعیین بیان نسبی ژن ها (Relative Expression)، میزان C_T به دست آمده با ژن مرجع گلیسر آلدهید-3 فسفات دهیدروژناز (GAPDH) مقایسه و نهایتاً با فرمول $2^{-\Delta\Delta C_T}$ محاسبه گردید. در بخش دیگر مطالعه، میزان پروتئین های apo A-I، apo B₁₀₀ و PON1 با روش وسترن بلاوت مورد اندازه گیری قرار گرفت و با گروه های کنترل مقایسه شد.

یافته ها: در غلظت های مختلف اورونئین II، میزان mRNA ژن apo B₁₀₀ در تمامی گروه ها افزایش پیدا کرد و بیشترین افزایش در غلظت های 50 nM (افزایش حدود 3 برابر) و 100 nM (افزایش حدود 2 برابر) مشاهده شده اما از نظر آماری تغییر معنی داری نشان نداد ($p = 0.63$). همچنین، میزان پروتئین های apo B₁₀₀ در تمامی گروه ها افزایش شدیدی یافت، بطوریکه در غلظت های 100 و 200 نانومولار (به ترتیب 1.8 و 2.3 برابر) بیشترین افزایش را نشان داد و اختلاف معنی داری بین گروه های تیمار شده و گروه کنترل مشاهده شد ($p = 0.004$). در رابطه با تأثیر اورونئین II بر بیان apo A-I، فقط در غلظت 200 nM

Abstract

Background and Objectives: Atherosclerosis is the result of a chronic vascular inflammation, lipid and leukocyte deposition in the arterial wall, specially coronary arteries. It is the most important cause of coronary artery disease (CAD). Dyslipidemias play a key role in pathogenesis of atherosclerosis. High production of apolipoprotein-B₁₀₀ in hepatocytes can increase the levels of apo B-containing lipoproteins and risk of atherosclerosis and eventually coronary artery disease. High-density lipoprotein (HDL) shows atheroprotective properties through several mechanisms, especially reverse cholesterol transport. Apolipoprotein A-I, the main protein component of HDL, is required for the efflux of cholesterol from peripheral tissues to the liver. In addition, paraoxonase-1 (PON1), an enzyme, associated with HDL may have a role in prevention of atherosclerosis through inhibition of lipid peroxidation in LDL particles. Increase in apo B and/or decrease in apo A-I levels are two important factors for dyslipidemia which can contribute to atherosclerosis. It is well-established that hypertension, as an independent cardiovascular risk factor, increases the risk of atherosclerosis. Urotensin II (UII), as the most potent vasoconstrictor, contributes in hypertension and also is related to atherosclerosis. Since hypertension with increased apo B-containing lipoproteins and decreased HDL/apo A-I levels are important pathogenic factors in atherosclerosis, the aim of this study was to investigate the effect of urotensin II on apolipoprotein B₁₀₀, apolipoprotein A-I and paraoxonase-1 gene expression at the mRNA and protein levels in a hepatic (HepG2) cell line.

Materials and Methods: HepG2 cells were treated with 10, 50, 100, and 200 nmol/L of urotensin II. The treatment experiments were done six times at different times ($n=6$). Total RNA and protein were extracted 24 hours after treatment and cDNA was synthesized. Real time Polymerase Chain Reaction (Real time PCR) was done using specific primers for the genes of interest, apo B₁₀₀, apo A-I and PON1. The cycle threshold (C_T) levels of each mRNA were determined at the certain PCR cycles. Relative expression of apo B₁₀₀, apo A-I and PON1 mRNA levels in conditioned media, normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. In addition, the protein levels of apo B₁₀₀, apo A-I and PON1 were also estimated and compared with the controls using western blotting method.

Results: The apolipoprotein B₁₀₀ mRNA levels were increased in all concentrations of urotensin II, with the highest levels at 50 nM (~ 3 times) and 100 nM (~ 2 times), however, the differences were not significant ($p = 0.63$). The apo B₁₀₀ expression at protein level was

increased gradually, so that it was increased significantly at 100 and 200 nM concentrations of UII by 1.8 and 2.3 times, respectively ($p = 0.004$). As for the effect of urotensin II on apolipoprotein A-I expression, the mRNA levels were decreased significantly at 200 nM concentration. There were no significant changes between experimental and control groups ($p = 0.152$). In addition, the protein levels of apo A-I were decreased gradually by increasing concentrations of UII in conditioned media, so that they were decreased significantly by 1.26 times at 200 nM concentration, compared with the control group; but, there were not significant changes following treatment with different concentrations of UII ($p = 0.144$). As for the effect of UII on PON1 expression, PON1 mRNA levels were increased significantly at 10 (~ 3 times) and 50 nM (~ 5.6 times) concentrations of UII, but they were decreased significantly at 200 nM concentration ($p = 0.019$). The protein levels of PON1 were also increased significantly at 10 (~ 1.3 times) and 50 nM (~ 1.7 times) compared with controls ($p < 0.001$), but they were not changed at 100 and 200 nM concentrations.

Conclusion: These data may show the positive effect of urotensin II on apolipoprotein B₁₀₀, probably through participating factors in synthesis, and post translational stability/degradation of apolipoprotein B₁₀₀. Although, there were no significant differences between experimental and control groups associated with apo B₁₀₀ mRNA levels. As for the effect of UII on apo A-I, there were no significant changes at mRNA and protein levels in different concentrations of UII; however, there was a decreasing effect at 200 nM concentration on both mRNA and protein levels of apo A-I. As for the effect of UII on PON1, there was an increase in PON1 mRNA and protein levels at 10 and 50 nM concentrations. Hence, UII may have a cardioprotective role at some concentrations via increasing PON1 expression, probably through a positive effect on transcription level. Since other proteins, such as lecithin cholesterol acyl transferase, are associated to HDL particles, UII may affect HDL metabolism by other mechanisms. In summary, UII, in high concentrations might be related to atherosclerosis through increasing apo B and/ or decreasing apo A-I and PON1.

Keywords: Urotensin II, Apolipoprotein B₁₀₀, Apolipoprotein A-I, Paraoxonase-I, HepG2 cell line.